



TITLE:

# Vasogenic Edemaに於ける局所脳pH及び局所脳エネルギー代謝の経時的变化

AUTHOR(S):

今高, 清晴

---

CITATION:

今高, 清晴. Vasogenic Edemaに於ける局所脳pH及び局所脳エネルギー代謝の経時的变化. 日本外科宝函 1987, 56(6): 600-612

ISSUE DATE:

1987-11-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/204058>

RIGHT:

# Vasogenic Edema に於ける局所脳 pH 及び 局所脳エネルギー代謝の経時的変化

(指導：菊池晴彦教授)

今 高 清 晴

〔原稿受付：昭和62年 8 月31日〕

## Sequential Changes of Regional Brain pH and Energy Metabolism after Cold-Induced Vasogenic Brain Edema

KIYOHARU IMATAKA

Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine,  
Kyoto University

Acid-base imbalance following cold-induced vasogenic brain edema was studied using umbelliferone histochemical method associated with regional changes of NADH and ATP. The in vivo study of cortical pH was also done. Evans blue (EB) was administrated as an indicator of blood-brain barrier damage.

Histochemical study revealed that ATP and potassium were already decreased and pH was markedly acidic change in the lesion at five minutes after injury. The cortex around the lesion showed slight increase of NADH with mild acidosis. Thereafter, the pH outside the lesion returned to neutral and remained stable up to twenty-four hours later. Increase of NADH was observed around and just below the lesion at two and six hours after injury, and it was well corresponded to the area of severe EB leakage.

The area of mildly alkalic change and potassium depletion was developed in the subcortical white matter at six hours with subsequent extension into the contralateral side, which was well corresponded to the extension of vasogenic brain edema. At the maximal extension of brain edema, EB leakage was minimal without increase of NADH. The decrease of ATP was mild and was found in a small area around the lesion, and this regional energy failure improved gradually even though the brain edema extended widely in the white matter.

In the in vivo study, pH in the cortical surface around the lesion at two hours was more acidic than that in the contralateral cortex. This difference in pH between the histochemical

---

Key words: Vasogenic edema, Histochemistry pH, Umbelliferone, Energy metabolism.

索引語：血管源性脳浮腫，組織化学法，pH，Umbelliferone，エネルギー代謝。

Present address: Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-Ku, Kyoto 606, Japan.

study and the in vivo study is probably due to the reflection of tissue pH in the former while of the intracellular pH in the latter.

Thus, the time course and extension of EB leakage corresponded well to the changes of NADH and ATP, but not to that of potassium and alkalic change, which corresponded to the extension of brain edema. Present study revealed that the tissue pH of vasogenic edema was alkalosis, which probably derived from extravasated plasma, and it overcame the intracellular acidosis. Relatively mild and transient energy failure was also noted in this model, and this corresponds well to the clinical course of vasogenic brain edema in which good functional recovery can be expected if treatment is appropriate.

## は じ め に

血管源性脳浮腫は、重症頭部外傷・脳腫瘍・脳内出血・脳膿瘍等さまざまな脳疾患に伴って発生する重要な合併症である。血管源性脳浮腫は脳血液関門 (BBB) の損傷によって起こるとされ<sup>1)</sup>、細胞外腔に血清蛋白が漏出すると共に、局所組織圧の上昇をきたし、その結果、脳浮腫の生じた部位やその近傍での脳血流量の低下や乳酸の蓄積が報告されている<sup>8,26,28)</sup>。乳酸の蓄積はエネルギー代謝障害と関連しており、またアシドーシスの増悪因子として作用すると思われる。一方、傷害された BBB から漏出する血漿の pH は、脳実質よりも更にアルカリ性であり<sup>27)</sup>、従って血管源性脳浮腫にはアシドーシスとアルカローシスの二つの要因が重なり合っていると推測されるが、従来より血管源性脳浮腫に於ける酸塩基平衡についての知見は乏しい。近年、多重標識を用いた組織化学法により、エネルギー代謝と酸塩基平衡の局所変化の評価が可能となってきた<sup>10)</sup>。酸塩基平衡の指標としては umbelliferone がよく用いられるようになってきているが<sup>7)</sup>、この蛍光性 pH 指示物質は、組織化学法で用いた場合は組織 pH ( $\text{pH}_i$ )<sup>6)</sup> を、また生体内に投与した場合は細胞内 pH ( $\text{pH}_i$ )<sup>23,24,25)</sup> を示すとされている。Csiba らは<sup>9)</sup>、umbelliferone を組織化学的手法に応用する事により、 $\text{pH}_i$  の定量化が可能な事を報告した。しかしながら彼らは、組織含水量の影響を検討しておらず、組織含水量の変化が著しい血管源性脳浮腫での、umbelliferone 組織化学法の適応の是非は不明であった。我々は umbelliferone 組織化学法に於ける種々の因子の影響について検討すると共に、本法を用いて、Wistar rat に凍結損傷による血管源性脳浮腫を作製し、局所脳  $\text{pH}_i$  の経時的变化を検討した。またそれに平

行して、主にミトコンドリア内の酸化還元状態の指標としての nicotinamide-adenine (NADH)、ミトコンドリア内でのエネルギー産生状態を示す adenosine triphosphate (ATP) 及び組織電解質バランスを示す potassium の組織化学法も行った。

更に umbelliferone を用いた組織化学法と生体内投与での pH の差異を検索するために、凍結損傷作製 2 時間後の同様のモデルを用いて、in vivo での umbelliferone 動注による脳表の pH も評価した。

## 装置及び方法

### A. umbelliferone 蛍光に影響を与える因子

umbelliferone の蛍光強度に影響を与える因子としては、pH・組織含水量・umbelliferone 濃度・血清蛋白等が考えられる。これらの因子について、umbelliferone の蛍光強度の違いを検討した。

#### 1. 含水量

犬の脳を剔出し、凍結乾燥法を用いて乾燥させ、脳組織の乾燥粉末を作製した。含水量の umbelliferone に対する影響を検索するため、脳乾燥粉末に phosphate buffer を加え、各々正常の白質、灰白質、及び浮腫組織の含水量 (70%, 80%, 90% weight) に一致するように、3 種類の含水量の異なった標本作製した<sup>13)</sup>。更に血清蛋白の影響を見るため、80% wt で血清蛋白を含む標本も同時に作製した。これらの標本を攪拌し、均等の脳組織標本とした。その標本の pH を pH メーター (Horiba glass elec trode, type F-8L, JPN) にて測定し、塩酸あるいは水酸化ナトリウム及び脳乾燥粉末にて pH、含水量を調整した後、cryostat 内 ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) にて凍結し、含水量別凍結切片用標本とした。

## 2. pH 指示用紙

3種類の umbelliferone 濃度の異なった溶液 (2.00, 0.125, 0.05% wt/volume) を作製 (溶質は umbelliferone 粉末=Tokyo Kasei Kogyo Co., Tokyo, JPN. 溶媒は 2 ethoxyethanol=Kanto chemical Co., INC, Tokyo, JPN)<sup>10)</sup> し, その中に cellulose acetate 膜を1時間浸透させ, 更に室温にて空気乾燥させ, umbelliferone 濃度の異なった3種類の pH 指示用紙を作製し, 以下の実験に用いた。

## 3. pH nomogram

### 1) 0.125% wt/vol pH用紙使用時

含水量が各々70%, 80%, 90%の pH 別凍結標本を用いた。-20°C の cryostat 内にて厚さ 16  $\mu$ m の凍結切片を作製し, pH 指示用紙上に重ねた。更にそれを, 予め 0°C に冷やしたガラス皿の上に置き, 水銀ランプ (HBD 200 watt; Carl Zeiss, D-7082 oberkochen, FRG) による 370 nm 励起 (フィルターは NO. 8507-730, Tmax 48%, dielectric interference filter, Nihon Sinku Kogaku Co., Kanagawa, Jpn) を行い, 450 nm 蛍光 (フィルターは Corning filters 3389 and 5562) を 135 mm レンズ (medical Nikkor) に装備した 35 mm カメラ (Nikon FE) にて写真撮影を行った (Film: Tri-x pan film ISO 400, aperture: 5.6, exposure time: 1sec.)。その後同様の装置を用いて 340 nm 励起 (NO. 8507-729, Tmax 46%, dielectric interference filter, Nihon Sinku Kogaku Co., Kanagawa, Jpn) を行い, 450 nm 蛍光の写真撮影を行った (same film and aperture, exposure time 4 sec.)。その写真濃度を, 濃度計 (Sakura densitometer PDA 65, Konishiroku Photo IND. Co., LTD.) を用いて測定し, 370 nm 励起時の 450 nm 蛍光強度と 340 nm 励起時の 450 nm 蛍光強度との差を用いて, 含水量別 (70%, 80%, 90% wt) pH 別 nomogram を作製した。

また更に, 一元配置分散分析法を用いて三群間の異なった含水量 (70%・80% 及び 90% wt) 標本に於ける pH (pH=6.2, 6.6, 7.0, 7.4) と蛍光濃度との関係を統計学的に評価した。

### 2) 2.00及び0.05% wt vol pH用紙使用時

pH 用紙の umbelliferone の濃度を2.00及び0.05% wt/vol とし, 上記と同様の方法にて検討した。凍結組織標本としては, 含水量70%及び90% wt のものを用いた。

## B. 凍結損傷モデルを用いての組織化学的 pH 検索

右に示す如く方法にて作製した時間別凍結損傷モデ

ル (5分, 2・6・12・24時間) を用いて, 各々10匹の pH の組織学的検討を行った。用いた umbelliferone 濃度は, 含水量の影響を最も受け難く, また充分な蛍光強度を有すると思われる0.125% wt/vol を用いた。

## C. 組織化学法での実験動物

性別にこだわらず 200~250 g の Wistar rat 75匹を用いた。時間別に各々5匹を用いて Evans blue (EB) 群を作製し, 他の50匹を非 Evans blue (non-EB) 群とした。手術直前までの動物の食餌は特に制限を行わなかった。sodium pentobarbital (40 mg/kg) の腹腔内投与により麻酔を行い, pancuronium bromide の静脈内投与による人工呼吸下にて実験を行った。右鼠径動・静脈に PE-10 のシリコンチューブを留置し, 動脈ルートは血圧のモニター及びガス分析に, また静脈ルートは薬剤投与に利用した。6, 12, 24時間モデルのルート確保は, in situ brain freezing<sup>20)</sup>前2時間の時点で行った。直腸温は, heat lamp を用いて 37°C 前後を保つようにした。なお, 動脈血ガス分析は in situ brain freezing の10分前行い, もし血圧や動脈血ガス濃度が正常範囲から大きく外れる動物は, 本実験には含めなかった。凍結損傷は, あらかじめ液化室素内に浸した鉄の棒 (直径 2 mm) を, 左頭頂部に30秒間当てることにより作製した。EB 投与群として各々の時間別に5匹を用いたが, EB は2.5%のもの 1 ml/kg を凍結損傷作製30分前の静脈内投与にて作製した。EB による蛍光の減弱の可能性を検討するため, 各々の時間帯に非 EB 投与群10匹作製した。凍結損傷作製後5分, 2・6・12・24時間後液化室素にて in situ brain freezing を行い, 液化室素内にて冠状断し, 液化室素内で紫外線照射を行い, NADH 蛍光の写真撮影を行った。その後 -20°C の cryostat 内にて, 16  $\mu$ m の凍結切片を作製し, 局所の pH は umbelliferone 法<sup>9)</sup>・ATP は luciferine-luciferase 法<sup>13)</sup>・potassium 濃度は Macallum's 法<sup>14)</sup> を用いて組織化学的に検索した。

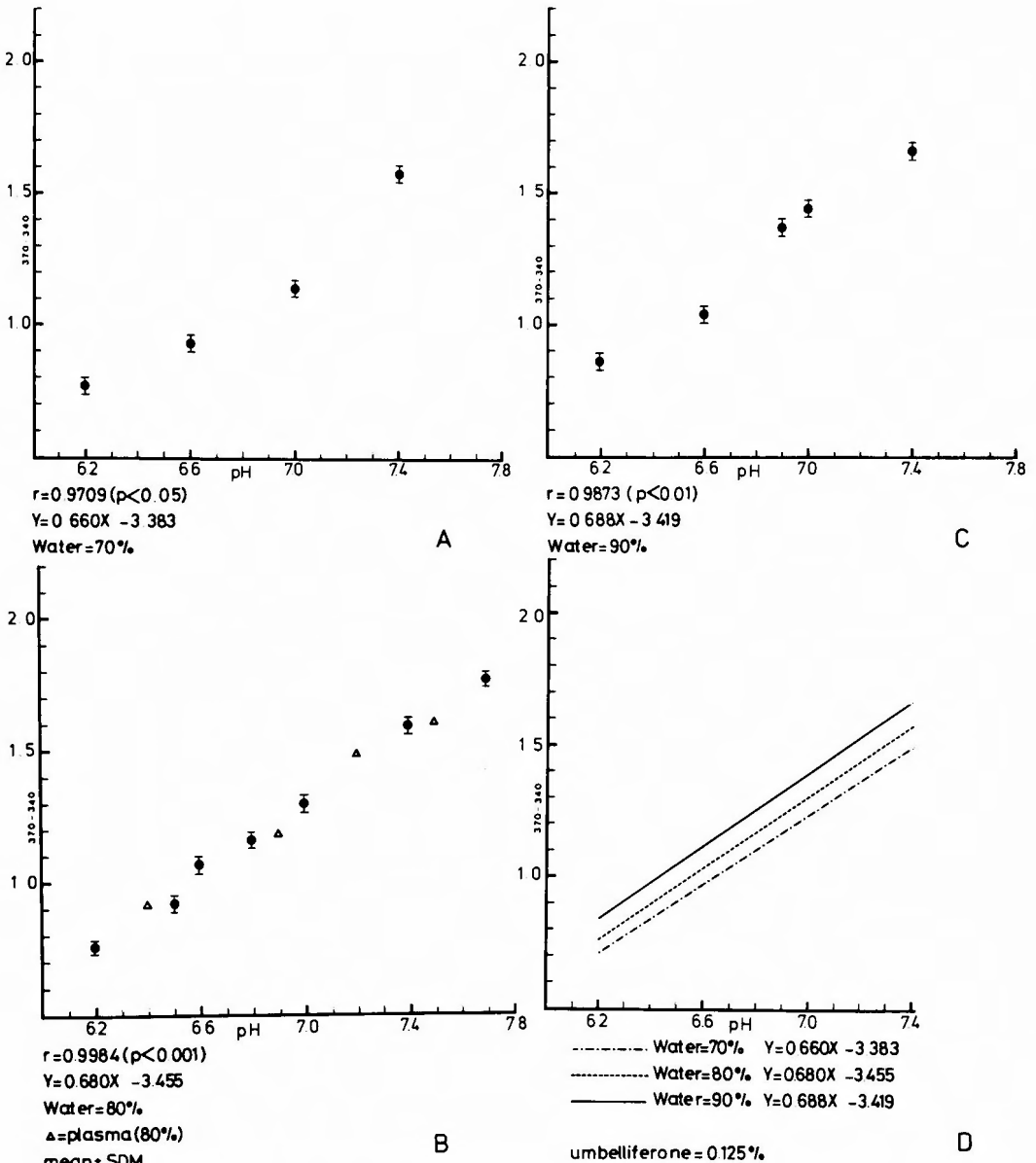
## D. in vivo での pH 測定

この実験では, 10匹の Wistar rat を用いた。左頭頂部に凍結損傷を作製後, 両側外頸動脈に逆行性に PE-10のシリコンチューブを挿入し, 両側内頸動脈内に umbelliferone 溶液<sup>23,25)</sup> を動注するための注入ルートとした。凍結損傷作製1時間後両側頭頂骨を除去し, 2時間後の umbelliferone 動注時の蛍光を写真撮影するために, 大脳皮質表面に傷をつけないように注意深く硬膜を除去した。凍結損傷作製2時間後に, 両側内

頸動脈内に同時に 0.05 ml の umbelliferone 溶液を動注し (計 0.1 ml), 10 秒後脳皮質表面を 370 nm 励起の光を照射し, 前項に示した方法にて写真撮影を行った。我々の用いた水銀ランプでは 340 nm 励起光は弱く, 450nm の蛍光を写真撮影するには適さなかったので写真撮影を行わなかった。このため in vivo での皮質

表面の細胞内 pH は, 患側半球と健側半球の比較により判定を行った。

なお別に, 凍結損傷作製範囲の骨窓と, EB 漏出範囲の冠状断の直径を比較し, 大脳皮質表層部の BBB 損傷範囲を比較した。



**Fig. 1.** The fluorescent intensity at an umbelliferone concentration of 0.125% wt/vol. Fluorescent intensities at (A) 70%, (B)80% and (C) 90% water content. D: Nomograms of the pH and the water content.

結 果

1. 0.125% wt/vol umbelliferone 溶液使用時

正常の白質に近い含水量70%/wt<sup>1)</sup>の標本を用いて、umbelliferone 蛍光の程度と pH との関係を検討した。これら2つのパラメーターの間には密接な相関関係 ( $r=0.9709$ ) が認められた (Fig. 1-A)。

正常の灰白質に近い含水量80%/wt<sup>1)</sup>の標本を用いた時のこれらのパラメーターも極めて密接な相関関係 ( $r=0.9958$ ) が認められた (Fig. 1-B)。また血清を混合し、含水量を80% wtとした標本を用いた場合も、同直線上に認められた (Fig. 1-B)。

浮腫状態の最大値とも言える含水量90%/wt<sup>3)</sup>とした場合でも同様の関係が認められた ( $r=0.9873$ ) (Fig. 1-C)。これらのデータを一括し Fig. 1-D) に示した。

2. 2.00及び0.05% wt/vol umbelliferone 溶液使用時

上記に示したものと同様の方法を用いて nomogram を作製し、Fig. 2-A 及び B に示した。

pH が上昇するに従い、370 nm 励起及び 340 nm 励

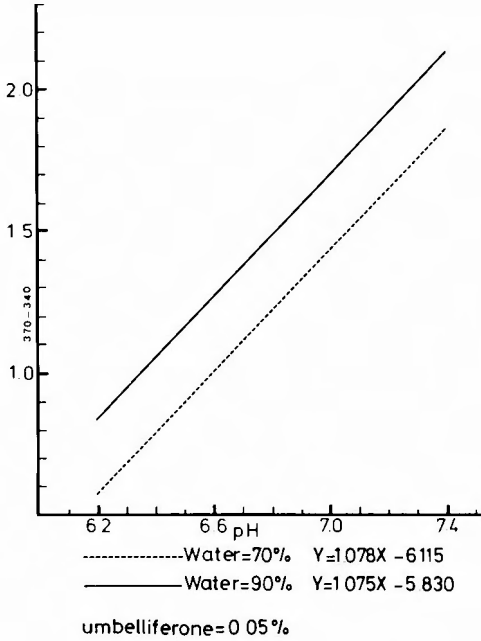
起での 450 nm 蛍光強度の差も、全ての標本例において直線状に上昇が認められた。しかしながら蛍光強度変化の程度は、含水量の違い及び umbelliferone 濃度の違いにより異なった。この変化の程度は、umbelliferone 濃度が0.125%/wt/volを用いた時が、最も少なかった。また、0.125%/wt/vol の濃度で umbelliferone を用いた場合、含水量が70%・80%及び90% wt の三群間で蛍光強度に有意差 ( $P<0.05$ ) を認めた。従って含水量によって蛍光強度が異なるため、pH 算出にあたっては含水量80%~90%での pH を求めることとし、半定量法にとどめた。

3. 凍結損傷作製後のエネルギー代謝及び pH の経時的变化

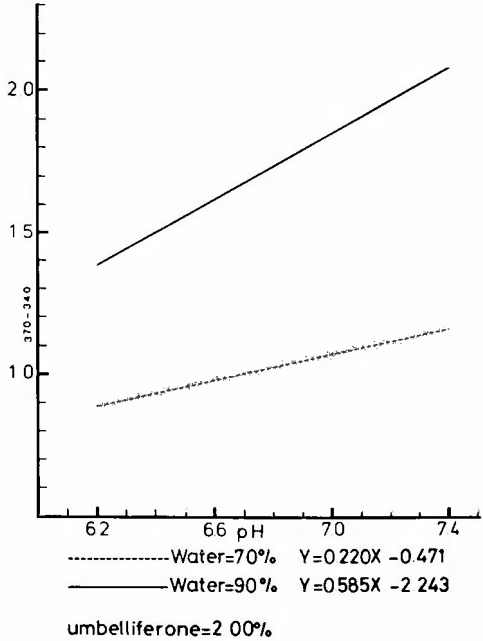
各々の実験に用いた動物間の生理状態に特に有意差を認めなかった (Table 1)。

1) 凍結損傷作製5分後 (Fig. 3)

EB の漏出部位は病巣内に局限していた。potassium や ATP もすでにその部位で低下を示し、同部位の強い酸性化 ( $\text{pH}_i=6.20$ ) が認められた。また、病巣半球皮質全体に若干の NADH 蛍光の増強と弱い酸性化



A



B

Fig. 2. Nomograms of the pH and the water content at 70 and 90% w/w water content. The change in the fluorescent intensity at umbelliferone concentrations of (A) 0.05% and (B) 2.00% w/v is illustrated.

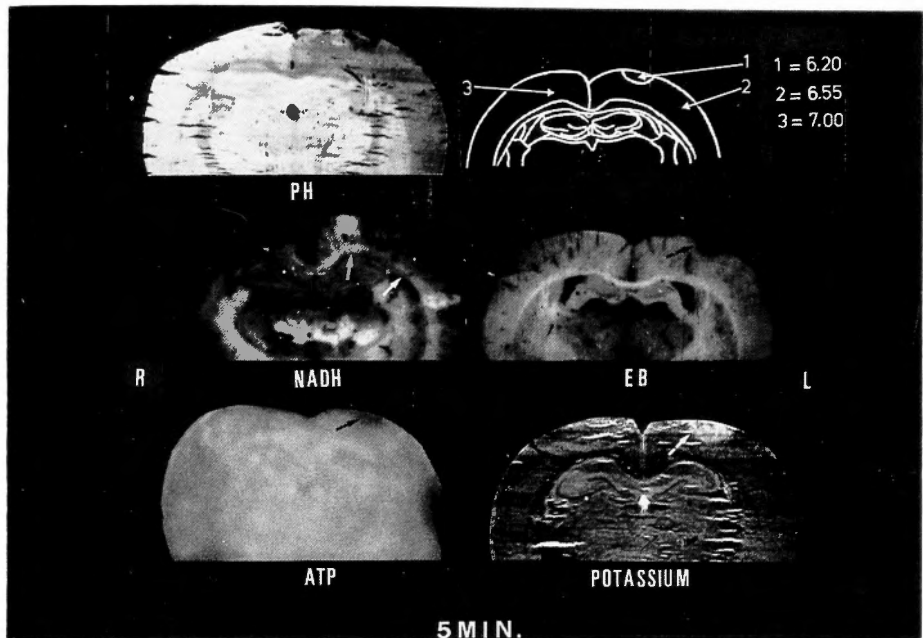


Fig. 3. Five minutes after cold injury. The NADH fluorescence was slightly increased (white arrows) and mild acidosis ( $\text{pH}=6.55$ ) was seen in the cortex on the side of the lesion. The NADH fluorescence was intense, especially around the lesion. The increased NADH fluorescence in the thalamus and the base of the brain was due to freezing artifact. A decrease in ATP (black arrow) and potassium (dotted white arrow), and acidosis ( $\text{pH}=6.20$ ) were seen within the lesion. EB leakage had already been within the lesion (dotted black arrow).

が認められた ( $\text{pH}_t=6.55$ ).

なお、病巣より離れた病側皮質の  $\text{pH}_t$  は、5分後のモデルで病側半球が軽い酸性化を示した以外は常に約6.90を示し、健側皮質の  $\text{pH}_t$  は常に約7.00を呈した。これらの値は、5分以後は全過程を通じほぼ一定

であった。

2) 凍結損傷作製2及び6時間後 (Figs. 4 and 5) 病巣周囲皮質において、NADH 螢光の増強、ATP 及び potassium の低下、更に軽いアルカリ化 (含水量を80%~90%/wt と推定した場合  $\text{pH}_t=7.09\sim7.25$ )

Table 1. Physiological variables The values given are means  $\pm$  SE. n=number of animals

series	groups (n)	BT ( $^{\circ}\text{C}$ )	MABP (mm Hg)	$\text{PCO}_2$ (mmHg)	$\text{PO}_2$ (mmHg)	pH
EB(+)	5 min (5)	$37.1 \pm 0.2$	$118 \pm 5$	$37.5 \pm 1.2$	$105 \pm 6$	$7.36 \pm 0.02$
	2 hrs (5)	$37.2 \pm 0.1$	$117 \pm 4$	$37.0 \pm 1.0$	$112 \pm 4$	$7.39 \pm 0.02$
	6 hrs (5)	$37.1 \pm 0.1$	$125 \pm 5$	$36.8 \pm 1.2$	$118 \pm 3$	$7.40 \pm 0.01$
	12 hrs (5)	$37.0 \pm 0.2$	$123 \pm 3$	$37.2 \pm 1.4$	$109 \pm 6$	$7.39 \pm 0.01$
	24 hrs (5)	$36.9 \pm 0.1$	$123 \pm 4$	$37.5 \pm 0.9$	$114 \pm 2$	$7.39 \pm 0.02$
EB(-)	5 min (10)	$37.1 \pm 0.1$	$119 \pm 4$	$36.5 \pm 0.8$	$106 \pm 5$	$7.37 \pm 0.01$
	2 hrs (10)	$37.1 \pm 0.1$	$120 \pm 3$	$36.9 \pm 0.6$	$116 \pm 2$	$7.39 \pm 0.01$
	6 hrs (10)	$37.0 \pm 0.1$	$124 \pm 4$	$37.0 \pm 0.9$	$112 \pm 4$	$7.40 \pm 0.01$
	12 hrs (10)	$36.8 \pm 0.1$	$123 \pm 5$	$37.2 \pm 0.8$	$107 \pm 5$	$7.40 \pm 0.01$
	24 hrs (10)	$36.9 \pm 0.1$	$120 \pm 4$	$36.2 \pm 1.0$	$114 \pm 3$	$7.37 \pm 0.01$
in vivo	2 hrs (10)	$36.8 \pm 0.1$	$118 \pm 5$	$37.1 \pm 0.7$	$109 \pm 4$	$7.39 \pm 0.01$

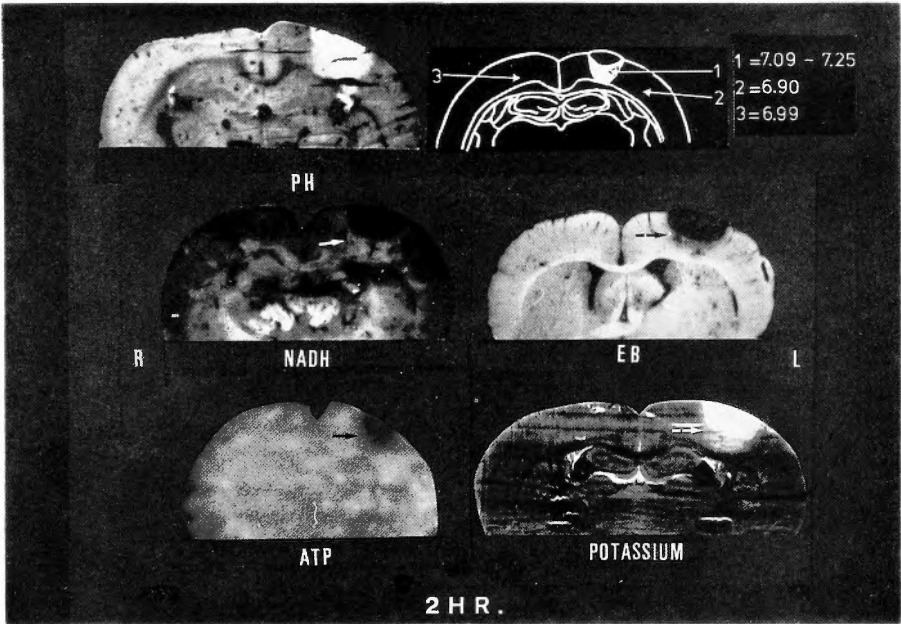


Fig. 4.

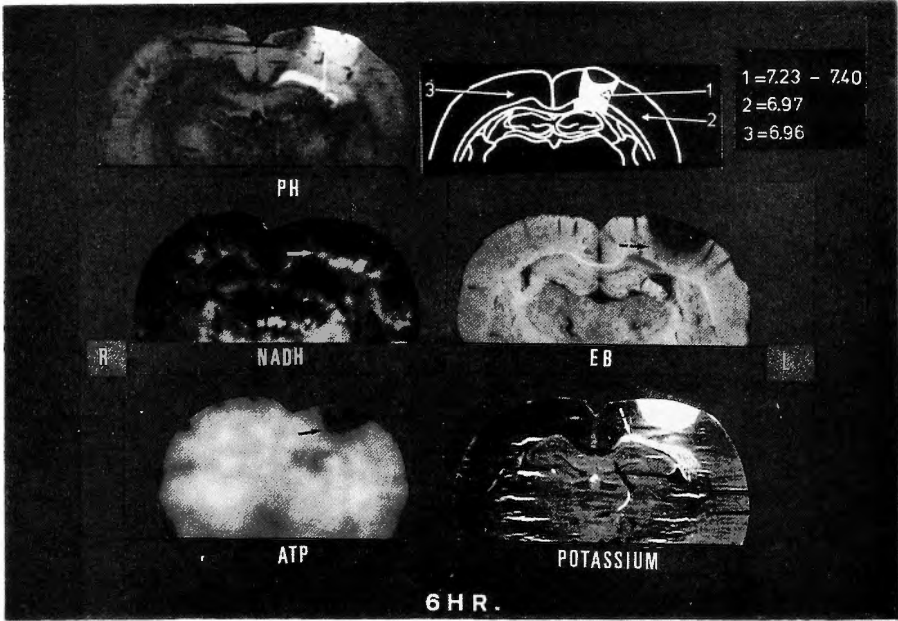


Fig. 5.

**Figs. 4 and 5.** Two and six hours after cold injury. Increased NADH fluorescence (white arrow) and decrease in ATP were observed just below and around the lesion (black arrow), and these findings corresponded well to the leakage of EB (dotted black arrow). The area of decreased potassium (dotted white arrow) and mild alkalosis (pH: 2 hrs = 7.9-7.25, 6 hrs = 7.23-7.40) extended widely.



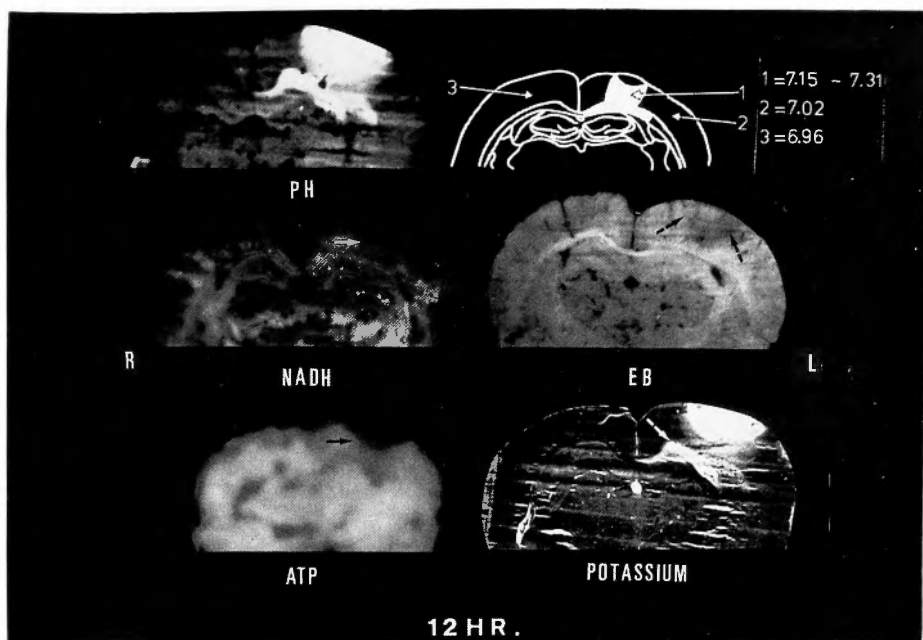


Fig. 6.

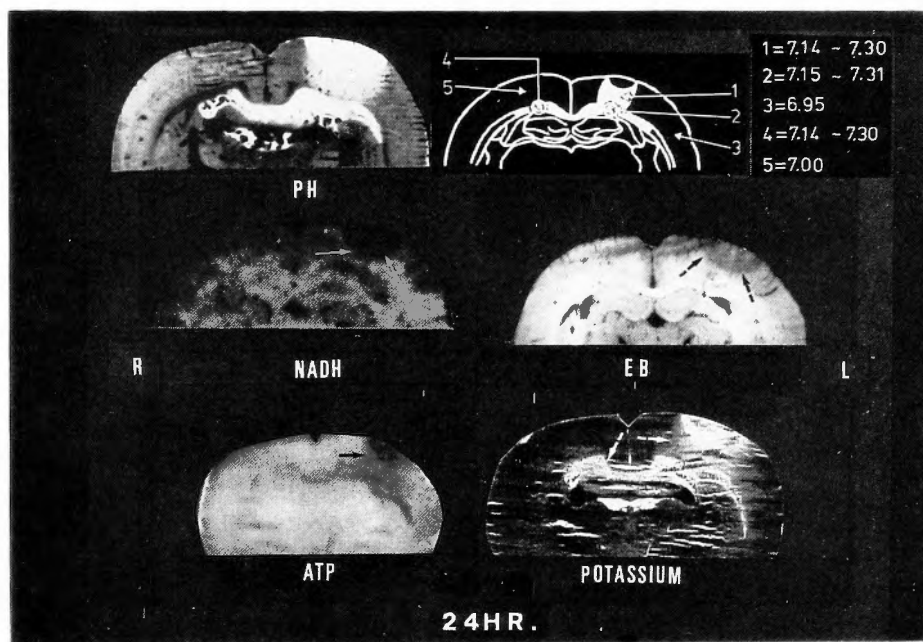


Fig. 7.

**Figs. 6 and 7.** Twelve and twenty four hours after cold injury. Note that there is no increase of NADH fluorescence (white arrows) and minimal leakage of EB (dotted black arrows). The decrease in ATP had not developed around and below the lesion (black arrow). However, the area of decreased potassium (dotted white arrows) and alkalosis ( $\text{pH}=7.14-7.31$ ) had become wider in the white matter and extended to the contralateral side.

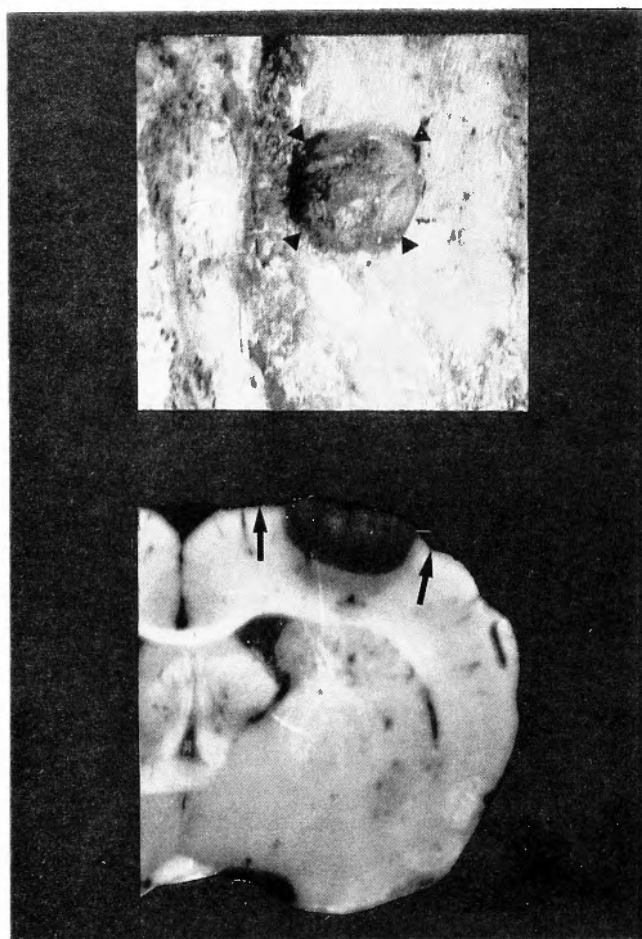


Fig. 8. Comparison of the diameter between bone window and EB leakage in coronal section on 2 hours after cold injury. Bone window is circurated by black triangles. The straight arrows pointed the cortical surface on the lesion side. The diameter was almost in the same size. This indicated that the cortical BBB around the lesion was almost intact.

が認められた。病巣直下の  $pH_t$  は 7.23~7.40 で、病巣周囲の EB の漏出範囲は、NADH 螢光の増強及び ATP の低下部位と良く似ていたが、potassium の低下部位及びアルカリ化を示す領域は時間経過と共に、ATP 低下部位より広範囲を示すようになり、病巣深部皮質及び白質に広がっていった。

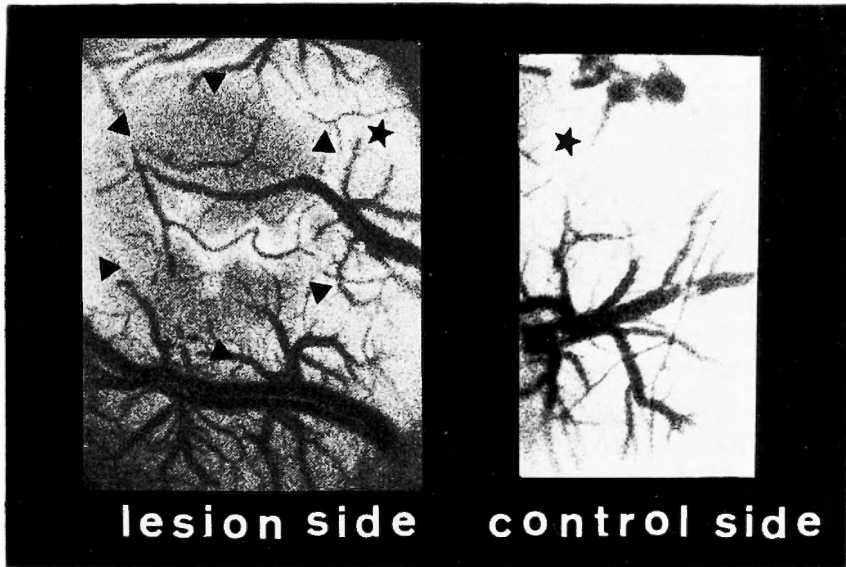
### 3) 凍結損傷作製12及び24時間後 (Figs. 6 and 7)

もはや NADH 螢光は認められなくなり、EB の漏出も僅かで、病巣内にのみ限局していた。potassium の低下部位及びアルカリ化を呈する部位 (病巣周囲の  $pH_t$  は 7.15~7.31、病巣深部は 7.14~7.30) は徐々に広範囲となり、病側白質を通り対側白質にまで達し

た。それゆえ、EB 漏出の時間経過と広がり、NADH 螢光の増強及び ATP の低下部位と良く似ていたが、potassium の低下及びアルカリ化を呈する部位とは異なっていた。後者2つのパラメーターはむしろ以前より報告のある<sup>11)</sup> 脳浮腫の広がり良く似ていた。

### 4. pH の in vivo study (Fig. 9)

病巣自体は、既に壊死組織となっていた。一方、凍結損傷作製部の骨窓の直径と EB 漏出部位の冠状断の直径を比較すると、ほぼ同一であり、病巣周囲の皮質表層の BBB はほぼ正常と思われた (Fig. 8)。そのため pH 測定は、病巣周囲の BBB が正常であると思われ



**Fig. 9.** In vivo study at 2 hours after cold injury. The fluorescent intensity of the cortex on the side of the lesion was lower than that of the contralateral cortex (Compare the two black asterisks on the lesion and control sides.). This decrease in fluorescent intensity indicates an acidic change. The lesion induced by cold injury is encircled by black triangles.

る皮質表面で行った。病巣に近接する同側の蛍光強度は、10匹中7匹に於て対側皮質の蛍光強度に比べて明らかな低下が認められた (Fig. 9) が、残り3匹では明かな左右差は認められなかった。このことから、定量的ではないが、病巣周囲の皮質表面の pH が健側に比べ酸性化していることが示唆された。それ故、組織化学法による pH と、in vivo study による pH とでは、異なった結果が得られた。

## 考 察

凍結損傷後の脳浮腫は、血管源性脳浮腫のモデルとして簡便かつ安定した結果が得られることから最も用いられるものの一つである<sup>11,19)</sup>。Klatzo らは、sodium fluorescein を用いて凍結損傷を検討し、6 時間から 48 時間の経過で徐々に病巣から対側の白質へ広がり、結局 72 時間で吸収されてゆく事を報告した<sup>11)</sup>。今回の実験では、EB を BBB の指標として用い、5 分以外のモデルはすべて in situ brain freezing 前 30 分に EB の静注を行った。血管外に出た EB は、拡散により浮腫先端部<sup>22)</sup>まで到達するが、EB の静注後 in situ brain freezing までの時間が短い場合は、浮腫先端部までは到達せず、損傷を受けた BBB の近傍に留まっている

と考えられ、今回のような EB 投与後短時間で検索する場合には、EB の漏出は BBB の破壊部位とほぼ一致すると考えられる。この実験に於て、脳浮腫の広がり最大となる凍結損傷作製 12~24 時間後では、EB の漏出は極端であった。この浮腫最大時に EB 漏出が僅かである原因としては、浮腫最大時には血漿の漏出による間質圧の上昇のため、静水力学的圧勾配の低下をきたし EB の漏出が減少する場合と、損傷を受けた血管の閉塞により、血管外漏出が低下する場合の二つが考えられる。<sup>3)</sup>

一方組織 potassium は、凍結損傷作製 5 分後では病巣内に、また凍結損傷作製 2 時間後では病巣内及び病巣直下に著明な低下が認められた。組織 potassium の低下は、病巣内が最も高度であった。それに反し、凍結損傷作製 6・12・24 時間後では、やや軽度の potassium の低下部位が、時間経過と共に損傷側白質から対側半球白質にまで及んでおり、これは以前より報告のある脳浮腫の広がり非常に良く一致していた<sup>4,11,12)</sup>。従って白質を中心に見られる軽度の potassium の低下は、浮腫液の増加による希釈効果が原因と考えられた。凍結損傷作製 6・12・24 時間後特に 12・24 時間後では、カリウムの低下部位と、EB の漏出部

位とで大きな差が認められ、このことから、凍結損傷による血管源性脳浮腫では、活発な BBB の開放は損傷後数時間に限られており<sup>3)</sup>、形態学的に BBB の基盤となる毛細血管は、壊死組織に置き換えられると考えられる。BBB が健常な部位では、BBB を通過する液の流れは浸透圧差によって調節されるが、BBB が傷害されると、浸透圧差よりむしろ静水力学的圧勾配により driving force が生じ<sup>2,3,22)</sup>、その driving force により毛細血管から浮腫液が漏出し、組織圧を高める。組織圧と driving force が平衡になった時に、組織液の漏出が止まると考えられる<sup>2,3,22)</sup>。

血管源性脳浮腫の局所脳エネルギー代謝に対する影響は、未だ充分に解明されていない。NADH の含有量は、ミトコンドリアの酸化還元状態を示し、その増加は、電子伝達系の障害、すなわちエネルギー代謝障害を示すとされている<sup>5,29)</sup>。本実験に於て、エネルギー代謝傷害は凍結損傷作製 2 及び 6 時間後に、病巣周囲及び病巣深部に限られていた。またそのエネルギー代謝傷害部位には、NADH 蛍光の増加が認められ、また蛍光の増加部位に一致して EB の強い漏出が認められた。これらの事実及び脳浮腫の進展が最大となり、健側半球白質にまで伸びる12・24時間後では、EB の漏出が殆ど認められず、更に NADH 蛍光の増加もないことから、このエネルギー代謝傷害は、BBB 破壊に伴う静水圧負荷による二次的な影響の為であろうと推測された<sup>9)</sup>。

浮腫脳における、ATP の減少の有無については報告によりまちまちである<sup>8,21,26)</sup>。Sutton 等は、浮腫液による希釈因子を考慮するなら、ATP は減少していないと述べている<sup>26)</sup>。我々の組織化学法による検討では、ATP の減少は凍結損傷作製 2 及び 6 時間後に於て病巣直下の小範囲のみであった。この所見は、広範囲に著明な ATP の減少が認められる実験的脳虚血とは明かに異なっていた<sup>10)</sup>。

我々は、 $pH_i$  及び  $pH_t$  を評価するために、umbelliferone を組織化学的に、もしくは in vivo にて使用した。umbelliferone は  $pH_t$  のみでなく  $pH_i$  も評価が可能であるとされている<sup>6,23,24,25)</sup>。更に非常に低価格であり、組織化学法を用いれば、凍結損傷作製 5 分後という非常に急性期の  $pH_t$  の変化も捉えることが出来る。umbelliferone に 370 nm 励起光を照射した場合 450nm 蛍光は pH に比例して増加し、340 nm 励起光を照射した場合は、ほぼ等吸収点であるために、450 nm 蛍光強度は pH に無関係に殆ど一定であるとされ

ている<sup>23,24,25)</sup>。 $pH$  を定量化するためには、370 nm 励起法による 450 nm 蛍光及び 340 nm 励起法による 450 nm 蛍光の差を求め、nomogram を作製する事が必要である<sup>9)</sup>。組織化学法では細胞内外の平均  $pH$ 、つまり  $pH_t$  を示す<sup>9)</sup>。それに反し、in vivo study での  $pH$  は、umbelliferone が易脂溶性で BBB を自由に通り細胞内に速やかに入ることから、 $pH_i$  を示すとされている<sup>23,24,25)</sup>。

$pH_i$  は  $^{14}C$ -DMO を用い、それと同時に  $^{14}C$ -Sucrose にて細胞外含水量を測定する事により組織化学的に評価することが可能であるが、平衡に達するためにはかなりの時間が必要であるため<sup>1)</sup>、急性期の  $pH_i$  を評価することは不可能である。

我々の組織化学法による検索では、凍結損傷 5 分後で病側半球皮質  $pH_t$  は酸性化を示したが、その後は脳浮腫が進展し、浮腫部位では弱いアルカリ化を呈した (Fig. 4, 5)。弱いアルカリ化は多分、血管外に漏出した血漿の  $pH$  (7.3-7.4<sup>11,17,27)</sup>) を反映していると考えられる。Mies 等はラット脳腫瘍モデルでの実験で、umbelliferone 組織化学法や  $^{14}C$ -DMO 単独の autoradiography にて腫瘍内及び腫瘍周囲の浮腫部分の  $pH_t$  を検索し、アルカリ性となっている事を報告した<sup>16)</sup>。Arnold 等も、同様のモデルにて腫瘍組織は決して酸性化を呈しておらず、腫瘍周囲の浮腫部位はアルカリ性を呈する事を報告し、その理由として細胞外含水量の増加及び血漿様物質の細胞外漏出の関与を強調している<sup>1)</sup>。そのため、血管源性脳浮腫の生じている場所の  $pH_t$  は、一般に弱いアルカリ性の変化を示していると考えられる。

それに反し我々の in vivo study では、凍結損傷作製 2 時間後の病巣周囲皮質表面の  $pH$  は、10匹中 7 匹に弱い酸性化が認められた。我々の実験で組織化学法による所見と in vivo study による所見で相違が認められたが、その理由として前者が  $pH_t$  (細胞内外を合わせた  $pH$  の平均) を示すのに反し、後者は皮質表面の  $pH_i$  を示すためと思われた。Wagner 等は、実験的頭部外傷による血管源性脳浮腫モデルを用いて検索し、皮質のみでなく病巣周囲白質に於ても乳酸が増加することを報告した<sup>28)</sup>。細胞内の糖代謝傷害により局所の乳酸増加が生じるため、病巣近位の  $pH_i$  は酸性化すると考えられる<sup>28)</sup>。しかしながらこの細胞の酸性化は、上記のように細胞外のアルカリ化により相殺されて、 $pH_t$  としてはアルカリ側にかたよるものと考えられた。

本実験でも示した様に、脳浮腫による ATP の減少と NADH の増加は、脳虚血に比べて非常に軽度なもので<sup>10)</sup>、更に一時的なものであった。また組織の損傷の程度も軽度であった。このことは臨床的に、脳浮腫が最大となる時期を患者が乗り越えた場合、機能的回復が非常に良いこととよく一致する。Penn 等は、神経学的欠損症状は浮腫により生じるのではなく、単に占拠性病変として生じるのであると述べているが<sup>18)</sup>、本実験でもその可能性を示唆するものと考えられる。

今回の実験で認められた組織のアルカリ化が局所の組織血流量や脳代謝の低下にどのような悪影響を及ぼしているのか、また、これらのアルカリ化を予防ないし治療する有効な手段は何かについては今後の検討を要すると考えられる。

## ま と め

1. 血管源性脳浮腫に於ける局所 pH 及び局所脳エネルギー代謝の経時的变化について述べた。
2. umbelliferone を用いることにより、組織 pH のみでなく細胞内 pH も測定可能である。
3. 凍結損傷作製極初期の組織 pH はアシドーシスを示す。
4. 血管源性脳浮腫初期の細胞内 pH はアシドーシスであるが、組織 pH はアルカローシスである。
5. 脳浮腫部位の組織 pH がアルカローシスとなるのは、漏出した血漿が脳実質よりも弱アルカリ性であるためと考えられる。
6. 血管源性脳浮腫に於ける局所脳エネルギー代謝障害の程度は虚血に於けるエネルギー代謝障害に比して軽度である。
7. 血管源性脳浮腫における局所脳エネルギー代謝障害は浮腫初期の bulk flow により生じる可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました京都大学医学部脳神経外科教授 菊地 晴彦 先生、京都大学名誉教授（現浜松労災病院長）半田肇先生に深謝の意を捧げます。また終始御指導御鞭撻いただいた京都大学脳神経外科講師石川正恒博士に深謝いたします。さらに実験に御協力御討論いただきました京都大学脳神経外科学教室の諸先生方に感謝いたします。

## References

- 1) Arnold J B, Junck L, Rottenberg D A: In vivo measurement of regional brain and tumor pH using [<sup>14</sup>C]-dimethylionazolidinedione and quanti-

- tative autoradiography. *J cerebral blood Flow Metab* 5: 369-375, 1985.
- 2) Brock M, Furuse M, Weder R, et al: Brain tissue pressure gradients. *Intracranial pressure II*, ed. Lundberg N, Ponten U, and Brock M: Springer-Verlag, Berlin Heidelberg-New York: pp. 215-220, 1975.
- 3) Bruce D A, Ter Weeme C, Kaiser G S: Mechanisms and time course for clearance of vasogenic cerebral edema. *Neural trauma*, edited by A J Popp et al. Raven Press, New York: pp. 155-171, 1979.
- 4) Chan P H, Longar S, Fishman R A: Phospholipid degradation and edema development in cold induced rat brain. *Brain Res* 277: 329-337, 1983.
- 5) Chance B, Cohen P, Jobsis F, et al: Intracellular oxidation reduction states in vivo. *Science* 3529: 499-508, 1962.
- 6) Csiba L, Paschen W, Hossmann K-A (1983): A topographic quantitative method for measuring brain tissue pH under physiological and pathophysiological conditions. *Brain Res* 289: 334-337, 1983.
- 7) Fink DW, Koehler WR: pH effects on fluorescence of umbelliferone. *Anal Chem* 42: 990-993, 1970.
- 8) Frei H J, Wallenfang Th, Pöhl W, et al: Regional cerebral blood flow and regional metabolism in cold induced oedema. *Acta Neurochir (Wien)* 29: 15-28, 1973.
- 9) Imataka K, Handa H, Ishikawa M, et al: The sequential changes of energy metabolism following cold-induced brain edema — A histochemical study —. *Brain and Nerve* 39: 447-453, 1987.
- 10) Kim S-H, Handa H, Ishikawa M, et al: Brain tissue acidosis and changes of energy metabolism in mild incomplete ischemia — Topographical study —. *J Cerebral Blood Flow Metabol* 5: 432-438, 1985.
- 11) Klatzo I, Piraux A, Laskowski E J: The relationship between edema, blood-brain barrier and tissue elements in a local brain injury. *Exp Neurol* 17: 548-564-1958.
- 12) Klatzo I, Chui E, Fujiwara K, et al: Resolution of vasogenic brain edema. *Adv Neurol Vol. 28: Brain Edema*, edited by J. Cervos-Navarro and R. Ferszt Raven Press, New York pp. 359-373, 1980.
- 13) Kogure K, Alonso O F: A pictorial presentation of endogenous brain ATP by a bioluminescent method. *Brain Res* 154: 273-284, 1978.
- 14) Macallum A B: On the distribution of potassium in animal and vegetable cells. *J Physiol* 32: 95-126, 1905.

- 15) Meyer FB, Anderson RE, Sundt TM JR, et al: Intracellular brain pH, indicator tissue perfusion electroencephalography and histology in severe and moderate focal cortical ischemia in the rabbit. *J Cerebral Blood Flow Methabol* **6**: 71-78, 1986.
- 16) Mies G, Paschen W, Csiba L, et al: Comparison of regional tissue pH measured with umbelliferone and  $^{14}\text{C}$ -DMO in experimental brain tumors of rat *J Cerebral Blood Flow Methabol* Raven Press, New York Vol **5**, Suppl 1: S247-S248, 1985.
- 17) Paymaster NJ, Engleson S: Calculation of pH of human erythrocyte from the distribution of 5, 5-dimethyl-2, 4-oxazolidinedione (DMO). *Acta Anaesthesiol Scand* **10**: 219-224, 1966.
- 18) Penn R D: Cerebral edema and neurological function; CT, evoked responses, and clinical examination. *Adv Neurol* Vol. 28: Brain Edema, Edited by J. Cervos-Navarro and R. Forszt Raven Press, New York, pp.383-394, 1980.
- 19) Pollay M, Stevens F A: Blood-brain barrier restoration following cold injury. *Neurol Res* **1**: 239-245, 1980.
- 20) Ponten U, Ratcheson R A, Salford L G, et al: Optimal freezing condition for cerebral metabolites in rats. *J Neurochem* **21**: 1127-1138, 1973.
- 21) Reulen H J, Medzihradsky F, Enzenbach R, et al: Electrolytes, fluid and energy metabolism in human cerebral edema. *Arch Neurol* **21**: 517-525, 1969.
- 22) Reulen H J, Graham R, spatz M, et al: Role of pressure gradient and bulk flow in dynamics of vasogenic brain edema. *J Neurosurg* **46**: 24-35, 1977.
- 23) Sundt TM JR, Anderson RE, Van Dyke RA: Brain pH measurements using a diffusible, lipid soluble pH sensitive fluorescent indicator. *J Neurochem* **31**: 627-635, 1978.
- 24) Sundt TM JR, Anderson RE: Intracellular brain pH and the pathway of a fat soluble pH indicator across the blood-brain barrier. *Brain Res* **186**: 355-364, 1980.
- 25) Sundt TM JR, Anderson RE: Umbelliferone as an intracellular pH-sensitive fluorescent indicator and blood-brain barrier probe. calibration and analysis. *J Neurophysiol* Vol. **44** 1: 60-75, printed in U.S.A
- 26) Sutton L N, Welsh F, Bruce D A Bioenergetics of acute vasogenic edema. *J Neurosurg* **53**: 470-476, 1980.
- 27) Waddell WJ and Bates RG: Intracellular pH *Physiol Rev* **49**: 285-329, 1969.
- 28) Wagner KR, Tornheim PA, Eichhold MK: Acute changes in regional cerebral metabolite values following experimental blunt head trauma. *J Neurosurg* **63**: 88-96, 1985.
- 29) Welsh F A, Rieder W: Evaluation of in situ freezing cat brain by NADH fluorescence. *J Neurochem* **31**: 299-309, 1978.